FR



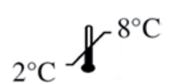
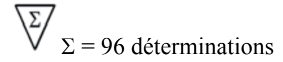
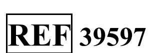


CE

Anti-INSULINE

pour analyses de routine

Test ELISA quantitatif pour l'identification des auto-anticorps circulants anti-Insuline native

IVD  LOT Voir étiquette externe   Σ = 96 déterminations 

UTILISATION PREVUE

Le kit ELISA Anti-Insuline (IAA) est un test pour la détermination quantitative des auto-anticorps circulants de type IgG spécifiques contre l'insuline humaine.

1. SIGNIFICATION CLINIQUE

Le diabète de type 1, aussi connu comme mellitus insulinodépendant (IDDM), est caractérisé par la destruction auto-immunitaire chronique des cellules bêta qui sécrètent l'insuline. Cette pathogenèse est probablement due à l'exposition de sujets génétiquement susceptibles à des agents environnementaux. On pense que la destruction auto-immunitaire des cellules bêta pancréatiques est complètement asymptomatique jusqu'à la perte de 80-90% des cellules. Ce processus peut commencer à tout âge et peut durer des années avant d'être complètement achevé.
La présence des auto-anticorps anti-insuline (IAA) chez les patients qui n'ont jamais été traités avec Insuline, au contraire des anticorps Insuline (IAb), est la preuve du processus de destruction des cellules bêta pancréatiques dans le diabète de type 1.
Les IAA sont particulièrement importantes quand on détermine le risque de diabète de type 1 car leur prévalence est significativement haute chez les sujets qui développent la maladie dans l'enfance et par ailleurs, ce sont le plus souvent les premiers auto-anticorps à être détectés avant le début de la maladie. La prévalence des IAA est inversement liée à l'âge du diagnostic.
Chez les patients diabétiques de type 1 avec un développement récent de la maladie à un âge inférieur à 5 ans, les IAA peuvent être déterminés chez plus de 90% des patients, tandis que chez les diabétiques de type 1 de plus de 20 ans, la prévalence des IAA est supérieure à 20 %.
La mesure des IAA, associée à celle des anticorps contre l'acide glutamique décarboxylase (Ac GAD65), de l'antigène protéine tyrosine phosphatase-(IA2) et des antigènes des cellules des îlots pancréatiques (ICA) forme la base de la stratégie actuelle pour la prédiction du développement futur du diabète de type 1.
En plus des auto-anticorps contre l'Insuline humaine, on peut souvent trouver des anticorps induits par un traitement à l'insuline. Ces anticorps sont présents à une concentration beaucoup plus élevée et sont principalement dirigés contre les fractions dénaturées (conformations différentes) de l'Insuline utilisée. Ceci conduit à la formation de complexes antigènes-anticorps et réduit ainsi l'activité de l'Insuline injectée. Pour une gestion optimale de la maladie quand on utilise de l'Insuline, il faut soumettre les patients à des tests réguliers.

2. PRINCIPE DE LA METHODE

Dans la première phase du test, les anticorps anti-Insuline de l'échantillon dilué se fixent à l'Insuline adsorbée sur les micropuits. Après une incubation de 60 minutes à 37°C, les composés non fixés sont éliminés par lavage.
Dans la phase suivante, les anticorps fixés réagissent avec le conjugué anti-IgG humaines couplé à l'horseradish peroxydase (HRP) ajouté. Le conjugué en excès est éliminé par un autre lavage après une incubation de 15 minutes à 37 °C. L' HRP qui reste lié à la plaque convertit la couleur du substrat TMB ajouté en un produit bleu. La réaction enzymatique est bloquée par ajout d'une solution acide après 15 minutes à 37 °C. L'absorbance du produit jaune obtenu est mesurée à 450 / 620 nm dans les 30 minutes. La DO obtenue est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps fixés.

3. REACTIFS, MATERIELS ET EQUIPEMENT

3.1. Réactifs et matériels fournis dans le kit

1. Standards IAA 5x (1 flacon= 1mL)
   STD1 **REF DCE002/8307-0**
   STD2 **REF DCE002/8308-0**
   STD3 **REF DCE002/8309-0**
   STD4 **REF DCE002/8310-0**
   STD5 **REF DCE002/8311-0**
2. Contrôle Positif (1 mL) **REF DCE045/8302-0**
3. Conjugué (15 mL) **REF DCE002/8302-0**
   Conjugué Anti-IgG-HRP humaines
4. Diluant échantillon (1 bouteille) 100 mL
   REF DCE018/8318-0
5. Microplaque recouverte (1 microplaque)
   Insuline adsorbée sur la microplaque
   REF DCE002/8303-0

5.1. Solution substrat (1 bouteille) 15 mL
   REF DCE004/8304-0

6. Solution d'arrêt (1 bouteille) 15 mL
   Acide sulfurique 0,25M **REF DCE005/8305-0**
7. Solution de lavage conc. 10X (1 flacon) 100 mL
   REF DCE006/8306-0

3.2. Réactifs nécessaires non fournis dans le kit

Eau distillée ou déionisée.

3.3. Matériel et équipement auxiliaire

Distributeurs automatiques.
Lecteur pour microplaques (450 nm).

4. PRECAUTIONS

- Ce kit est uniquement pour diagnostic in vitro.
- Suivre attentivement les instructions.
- Respecter la date d'échéance présente sur l'étiquette.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Ne pas utiliser de réactifs d'autres fournisseurs.
- Il est important que le temps de réaction de chaque puit soit le même pour la reproductibilité des résultats ;

il est donc conseillé d'éviter le time shifting durant la distribution des réactifs.

- Tous les réactifs doivent être conservés dans le récipient d'origine entre 2-8°C avant l'utilisation.
- Les réactifs 1, 2 et 8 contiennent de petites quantités (< 0.1 % p/p) d'azide de sodium comme conservateur. Eviter le contact avec la peau ou les muqueuses.
- Les matériels d'origine humaine utilisés pour la préparation de ce kit ont été analysés et sont non réactifs aux HIV 1 et 2 et aux anticorps HCV et Hbs Ag, mais doivent quand même être traités comme potentiellement infectés.
- Dans tous les cas, toutes les règles relatives à la protection générale et individuelle pour l'utilisation de ce kit doivent être appliquées.

5. PROCEDURE

5.1. Préparation du Conjugué

La solution anti- IgG-HRP humaines est stable jusqu'à 4 semaines entre 2 - 8° C après l'ouverture.

5.2. Préparation de la Solution de lavage

Préparer une quantité suffisante de solution de lavage en diluant la solution de lavage concentrée 1+9 avec de l'eau distillée ou désionisée. Par exemple, diluer 50 ml de la solution concentrée avec 450 ml d'eau distillée. La solution ne doit pas présenter de cristaux avant la dilution ; dissoudre éventuellement les cristaux en chauffant au max à 37 °C. La solution diluée peut être conservée entre 2 et 8 °C jusqu'à 30 jours.

5.3. Préparation de l'échantillon

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est séparé par centrifugation. Ne pas utiliser d'échantillons lipémiques ou hémolysés. **Il ne faut pas utiliser de plasma**. Les échantillons peuvent être conservés entre 2 - 8 °C jusqu'à 3 jours. La conservation à long terme se fait à - 20 °C.
Eviter les cycles de congélation et décongélation répétés. Les échantillons doivent être dilués 1 + 100 avec le Diluant échantillon.
Exemple: 5 µl échantillon + 500 µl diluant échantillon.

5.4. Procédure

Le kit contient une microplaque avec 8x12 puits recouverts d'antigène insuline. Le nombre de barrettes utilisées dans chaque essai dépend du nombre d'échantillons à analyser. Si on utilise les 12 barrettes, ce test permet d'analyser un total de 42 échantillons de sérum en double.
NOTE IMPORTANTE: Porter tous les réactifs, y compris les sérums, à température ambiante (18-25°C) avant l'analyse.

Réactif	Standard /Contrôles	Echantillon	Blanc
Echantillon dilué		**100 µL**	
Standard S1-S5	**100 µL**		
Contrôle	**100 µL**		
Couvrir la microplaque et incuber pendant 1 heure à 37°C. Enlever le mélange de réaction, laver en ajoutant dans chaque puit 0,3 mL de solution de lavage diluée; répéter le lavage deux fois en enlevant complètement la solution.			
Conjugué	**100 µL**	**100 µL**	
Couvrir la microplaque et incuber pendant 15 minutes à 37°C. Enlever le mélange de réaction, laver en ajoutant dans chaque puit 0,3 mL de solution de lavage diluée; répéter le lavage deux fois en enlevant complètement la solution.			
Substrat	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Incuber 15 minutes à 37°C dans l'obscurité.			
Solution d'arrêt	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Lire l'absorbance (E) à 450 nm en mettant à zéro avec le blanc			

La procédure de lavage est cruciale. Un lavage insuffisant entraîne une précision faible et une DO faussement élevée. Sans agitation, la DO mesurée sera 20% plus basse avec une perte de sensibilité.

6. RESULTATS

6.1. Courbe standard

Tracer les moyennes des répliques des valeurs de DO des standards 1 - 5 sur l'axe des ordonnées, axe des y, contre leurs concentrations respectives IAA-Ab sur l'axe des abscisses, axe des x. Tracer la courbe qui s'approche le plus des points obtenus.
La concentration des anticorps anti-insuline, des contrôles et des échantillons inconnus est lue directement en U/ml en reportant la valeur de la DO à 450 nm sur la courbe standard.
Le kit IAA peut aussi être utilisé avec un Computer Assisted Analysis en utilisant un logiciel capable de tracer des courbes avec spline smoothing fit.

Exemple:

Echantillon	DO (a) 450 nm	DO (b) 450 nm	DO (moyenne)	IU / ml
Standard **1**	0.082	0.073	0.078	**0.1**
Standard **2**	0.288	0.226	0.257	**1**
Standard **3**	0.824	0.720	0.772	**5**
Standard **4**	1.804	1.700	1.752	**10**
Standard **5**	2.697	2.607	2.652	**20**
Contrôle Pos.	1.360	1.323	1.342	8.0
Patient 1	0.540	0.530	0.535	3.0

Critère de validation:
Les échantillons avec une DO plus élevée par rapport au Standard 5 doivent être dilués avec le diluant échantillon et la concentration des anticorps de IAA / IA doit être calculée en appliquant le facteur de dilution.

6.2. Valeurs de référence

anti-IAA	
négatif	< 2.4 U/ml
positif	≥ 2.4 U/ml

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres plages de références normales et pathologiques pour les niveaux d'anticorps anti-IAA dans le sérum. Donc, les valeurs reportées ci-dessus doivent être considérées uniquement comme indication.

7. CARACTERISTIQUES DE LA PROCEDURE

7.1. Calibration

Le kit IAA est calibré artificiellement et les concentrations de IAA sont exprimés en U / ml.

7.2. Linéarité

En considérant la nature hétérogène de la population des anticorps, leur spécificité et affinité, les valeurs théoriques attendues pour les dilutions des anticorps IAA, pourraient dans certains cas ne pas correspondre à la concentration mesurée au cours d'un test de récupération.

7.3. Spécificité et Sensibilité

Les résultats disponibles montrent une sensibilité relative de 60% et une spécificité relative de 90 %. Les valeurs relatives pour la sensibilité et la spécificité se réfèrent aux résultats obtenus avec le Golden Standard IAA RIA. On ne connaît pas d'autres possibilités pour la mesure des anticorps Insuline pour l'utilisation en routine.

7.4. Limite de détection

La sensibilité analytique (limite de détection ou plus faible quantité détectable, 0 +/- 3 DS) est établie à 0,08 U/ml.
La sensibilité fonctionnelle est mesurée comme 20 % du CV inter-tests à 0,9 U/ml.

7.5. Variation Intra et inter-tests

Intra-test			Inter-tests		
Echant. n°	Moyenne Concentration (U/ml)	CV (%)	Echant. n°	Moyenne Concentration (U/ml)	CV (%)
1	1.8	9	4	2.4	8
2	6.0	7	5	8.2	6
3	14.3	9	6	17.2	10

8. DISPOSITIONS POUR L'ELIMINATION

Les réactifs doivent être éliminés en accord avec les lois locales.

BIBLIOGRAPHIE

- Hirata Y, H Ishizu, N Ouchi, S Motomura, M Abe, Y Hara, H Wakasugi, I Takahashi, H Sakano, M Tanaka, H Kawaao & T Kanesaki: Insulin autoimmunity in a case with spontaneous hypoglycemia; Japan J Diabet 1970, 13: 312-319
- Palmer JP, CM Asplin, P Clemens, K Lyen, O Tatpati, PK Raghu & TL Paquette: Insulin antibodies in Insulin-dependent diabetes before Insulin treatment; Science 1983, 222:1337-1339
- Palmer JP, CM Asplin, PK Raghu, P Clemens, K Lyen, O Tatpati, B McKnight, TL Paquette, M Sperling, L Baker & R Guthrie: AntiInsulin antibodies in Insulin-dependent diabetes before Insulin treatment - a new marker for autoimmune beta cell damage?; Pediatr Adolesc Endocrinol 1986, 15:111-116
- Ziegler, AG, R Ziegler, P Vardi, RA Jackson, JS Soeldner & GS Eisenbarth: Life-table Analysis of Progression to Diabetes od Anti-Insulin Autoantibody-positive Relatives of Individuals with Type 1 Diabetes; Diabetes 1989, 38:1320-1325
- Williams AJK, PJ Bingley, E Bonifacio, JP Palmer & Eam Gale: A novel Micro-assay for Insulin Autoantibodies; J Autoimmunity 1997; 10:473-478
- Lindberg B, SA Ivarsson, M Landin-Olsson, G Sundkvist, L Svanberg & A Lernmark: Islet autoantibodies in cord blood from Children who developed Type I (Insulin-dependent) diabetes mellitus before 15 years of age; Diabetologia 1999; 42:181-187- Potter KN & T J Wilkins: The molecular specificity of Insulin autoantibodies; Diabetes Metab Res Rev 2000; 16:338-353

SUGGESTIONS POUR LA RESOLUTION DES PROBLEMES /TROUBLESHOOTING

ERREURS CAUSES POSSIBLES/SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'échantillon
- absence distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution de l'échantillon (ex. Distribution accidentelle des réactifs en séquence erronée ou provenant de flacons erronés, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basses)
- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)
- temps d'incubation trop bref, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop hautes)
- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (faible degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non complètement enlevé)

Valeurs inexplicables hors échelle
- contamination de pipette, embouts ou récipients- lavages insuffisants (conjugué pas complètement enlevé)

CV% intra-test élevé
- réactifs et/ou strip non portés à température ambiante avant l'utilisation
- le laveur pour microlamelles ne lave pas correctement (suggestion: nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-test élevé
- conditions d'incubation non constantes (durée ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler la séquence de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs

Ed 10/2009

DE *Verwendete Symbole*

EL *Επεξήγηση συμβόλων*

EN *Explanation of symbols*

ES *Explicación de los símbolos*

FR *Explication des symboles*

IT *Spiegazione dei simboli*

PT *Significado dos símbolos*

IVD	DE EL EN ES FR IT PT	In-vitro-Diagnostikum In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή In vitro diagnostic medical device Para diagnóstico in vitro Dispositif médical de diagnostic in vitro Dispositivo di diagnostica in vitro Dispositivos médicos para diagnostico in vitro		DE EL EN ES FR IT PT	Hergestellt von Κατασκευαστής Manufacturer Fabricado por Fabriqué par Fabbricante Produzido por
REF	DE EL EN ES FR IT PT	Bestellnummer Αριθμός καταλόγου Catalogue number Número de catálogo Références du catalogue Numero di catalogo Número do catálogo	yyyy-mm	DE EL EN ES FR IT PT	Herstellungsdatum Ημερομηνία κατασκευής Date of manufacture Fecha de producción Date de fabrication Data di produzione Data de produção
yyyy-mm-dd	DE EL EN ES FR IT PT	Verwendbar bis (letzter Tag des Monats) Χρήση έως (η τελευταία ημέρα του μήνα) Use by (last day of the month) Fecha de caducidad (usar antes del último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar até (antes do último dia do mês)		DE EL EN ES FR IT PT	Biogefährdung Βιολογικός κίνδυνος Biological risk Riesgo biológico Risque biologique Rischio biologico Risco biológico
	DE EL EN ES FR IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Read instructions for use Consultar las instrucciones de uso Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE EL EN ES FR IT PT	Chargenbezeichnung Αριθμός παρτίδας Batch code Código de lote Numéro de lot Codice del lotto Lote
Σ Σ = xx	DE EL EN ES FR IT PT	Ausreichend für "n" Tests Το περιεχόμενο επαρκεί για "n" δοκιμασίες Contents for "n" tests Contenido suficiente para "n" ensayos Contenu suffisant pour "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Conteúdo suficiente para "n" testes	**Cont.**	DE EL EN ES FR IT PT	Inhalt Περιεχόμενο του κιτ Contents of kit Contenido del kit Contenu du coffret Contenuto del kit Conteúdo do kit
Max Min	DE EL EN ES FR IT PT	Temperaturbereich Όρια θερμοκρασίας Temperature interval Temperatura de conservación Limites de température de conservation Limiti di temperatura Intervalo de temperatura			



Manufacturer:
DiaMetra S.r.l. Headquarter:
Via Garibaldi, 18
20090 SEGRATE (MI)
Tel. 0039-02-2139184 - 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufacturing site:
Via Giustozzi 35/35a
Z.I Paciana
06034 FOLIGNO (PG) ITALY.
Tel. 0039-0762-24864
Fax 0039-0762-316197
E-mail: info@diametra.com

UK
UNITED KINGDOM
Distributed by
A. Menarini Diagnostics Ltd
405 Wharfedale Road
Winnersh - Wokingham
Berkshire RG41 5RA

DE
DEUTSCHLAND
Vertrieb durch
A. Menarini Diagnostics
Eine Division der
Berlin-Chemie AG
Glienicker Weg 125
12489 Berlin

EL
Διανέμεται στην
ΕΛΛΑΔΑ από την
A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argyroupolis
Attiki

ES
ESPAÑA
Distribuido por
A. Menarini Diagnosticos S.A.
Avenida del Maresme,120
08918 Badalona
Barcelona

FR
FRANCE
Distribué par
A. Menarini Diagnostics
France S.A.R.L.
3-5, Rue du Jura
BP 70511
94633 Rungis Cedex

IT
ITALIA
Distribuito da
A. Menarini Diagnostics
Via Lungo l'Ema, 7
50012 Bagno a Ripoli
Firenze

PT
PORTUGAL
Distribuido por
A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2°B
2770-203 Paço de Arcos